

生体内の微量元素に関する考察 (第8報)

— コバルト —

舟 木 行 雄

A Consideration of Trace Element in the Organism (Part-8)

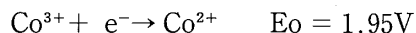
— Cobaltum —

Yukio FUNAKI

I 物理化学的性質

コバルト (以下 Co) は原子番号27番、原子量58.94、第8族、第4周期の遷移元素である。電子配置は $(1s)^2(2s)^2(2p)^6(3s)^2(3p)^6(3d)^7(4s)^2$ で、酸化状態は $Co\bar{o}$, Co^0 , Co^+ , Co^{2+} , Co^{3+} , Co^{4+} , Co^{5+} が知られている¹⁾。 Co^0 および $Co\bar{o}$ の化合物はほとんどみられないが、わずかに $Co\bar{o}$ 化合物として $H[Co(CO)_4]$ がみだされている。生体内では Co^+ , Co^{2+} および Co^{3+} として存在していて²⁾、Zn, Fe, Se と相互作用をする³⁾。

酸化還元電位をつぎに示す⁴⁾。



原子半径は1.26 Å、イオン半径は6配位として Co^{2+} は0.72 Å, Co^{3+} は0.63 Åである⁵⁾。Coには同位元素はなく、 ^{59}Co のみである。しかし、人工放射性同位元素として ^{60}Co があり、半減期は5.26年、 β 粒子と γ 線を放射する。

Coは種々の金属に添加して耐蝕、耐熱性合金をつくる。Coには2つの同素変態が知られている。すなわち、400°C以下と1015°C以上の温度では α -Coの最密六方晶 $a=2.492 \text{ Å}$, $c=4.056 \text{ Å}$, $c/a=1.63$ であり、この温度の間では β -Coの面心立方晶 $a=3.525 \text{ Å}$ が存在する⁵⁾。

II Coの分布

1. 地球環境における Co

大気中に存在する金属元素中、濃度のもっとも高い元素はNaの $1.4 \sim 75 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、Coの濃度は 0.0020

$\sim 0.0059 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、第12位である⁶⁾。

地表におけるCo濃度はクラーク数 4×10^{-3} 、第29位で、地殻中に20ppm、土壌中に8ppm、堆積物中に83ppm、また、主要鉱石はスクッテルド鉱 $CoAs_2$ 、輝コバルト鉱 $CoAsS$ で、Cu, Ni, Pbの鉱石中にも含まれている⁷⁾。

海水中のCo濃度は $8 \times 10^{-5} \text{ mg}/\text{dm}^3$ 、河川水中のCo濃度は $2 \times 10^{-4} \text{ mg}/\text{dm}^3$ (世界の主な河川水中の平均値)である⁸⁾。

2. 海水中 Co の生物濃縮

海水中に生息する生物は、何からの形式で海水を体内に取り込んで生活している。海水中生物体内の水および各種元素は海水および海水中の各種元素と平衡状態にある。海水中的のある生物が海水中的のある元素を生体内に取り込んで濃縮する程度を表すのが濃縮係数 concentration factor で、次式によって表す。

$$\text{濃縮係数} = \frac{\text{生体内の元素量}(\text{mg}/\text{kg})}{\text{海水中の元素量}(\text{mg}/\text{kg})}$$

濃縮係数は元素量の分布状態に関して生物体と海水中的の元素濃度の平衡定数である。すなわち、濃縮係数の大きい元素ほど生体内にその元素をより多く取り込み、濃縮する能力が高いことを意味する。海水中生物のCo濃縮係数例を表—1^{9),10)}に、貝類のCo濃縮係数例を表—2¹¹⁾に示す。

表—1 海水中生物のCo濃縮係数

| 生物 | 海藻類 | 無脊椎動物 | 魚類 | 貝類 |
|------|------|-------|-----|--------|
| 濃縮係数 | 1000 | 1000 | 100 | 24~260 |

表-2 貝類のCo濃縮係数

| 貝類 | ハマグリ | | アサリ | | シジミ | |
|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 肉部 | 殻部 | 肉部 | 殻部 | 肉部 | 殻部 |
| 濃縮係数 | 960 | 300 | 300 | 400 | 410 | 300 |

3. 生体内における Co

ヒト生体内における Co 存在量は約1.2mgで、体内における Co 分布は、肝臓・腎臓には灰化物1g 当り4~5 μ g、肺臓・皮膚・筋肉には灰化物1g 当り3~5 μ g で¹²⁾、肝臓や脳中の Co は大部分がビタミン B₁₂ (B₁₂)由来であるが、その他の組織には B₁₂以外の Co が大部分であると報告されている¹³⁾。また、人乳中の Co は1dm³当り平均12 μ g である¹⁴⁾。

B₁₂における Co の酸化状態は Co³⁺であり、Co²⁺、Co⁺に還元されたものも酵素反応の中間体として作用する。含 Co 酵素中における酸化状態は Co²⁺である。

成人体内には約2.5ng の B₁₂およびその誘導体が存在し、血液中には1cm³当り約2 \times 10⁻⁴ μ g 含まれている。表-3¹⁵⁾にヒト各組織中の Co および B₁₂量を示す。

表-3 ヒト組織中と全身中のCoおよびB₁₂量

| 組織(μ g/g) | 全Co量 | B ₁₂ 量 | B ₁₂ 中Co量 |
|----------------|-------------|-------------------|----------------------|
| 骨 | 0.036 | | |
| 肝 臓 | 0.013~0.031 | 0.555 | 0.0202 |
| 筋 肉 | 0.016 | 0.09 | 0.0039 |
| 腎 臓 | 0.012 | 0.21 | 0.0091 |
| 脳 | 0.0055 | 0.081 | 0.0035 |
| 全身*(mg) | 1.2 | 5.0 | 0.181 |

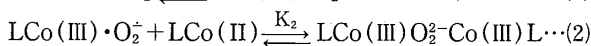
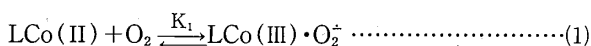
* 全身は体重70kg

III Co の生体内作用

1. Co の酸素結合体 (モデル)

遷移金属錯体の多くが O₂ と結合することは周知のことであるが^{3), 16~20)}、Co 錯体は特に多くの研究がなされていて、Co 錯体は Co-C 結合をもつ機能モデルとして扱われている。

Co (III) 錯体では、O₂ 分子は分子内酸化還元反応によって Co に結合する。

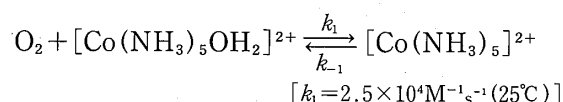


ここでは Co は酸化され、O₂ は還元される。反応(1)では O₂ は O₂⁺ に、反応(2)では O₂²⁻ にまで還元される。これらの活性酸素の O-O 結合距離を表-4²¹⁾に示す。

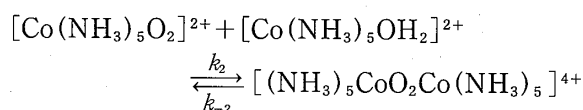
表-4 各種 2 原子酸素の結合距離

| 種 類 | O-O結合距離[Å] |
|------------------------------|------------|
| O ₂ ⁺ | 1.12 |
| O ₂ | 1.20 |
| O ₂ ⁻ | 1.32 |
| O ₂ ²⁻ | 1.49 |

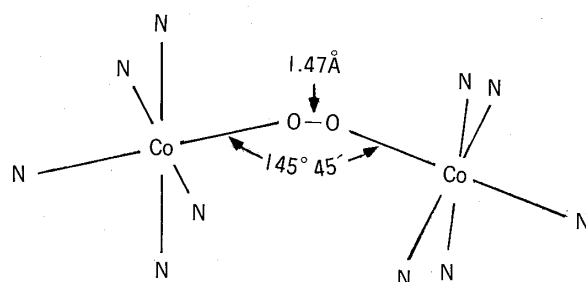
一般に μ -ペルオキシ錯体は安定で、非水溶媒、たとえば N,N-dimethyl formamide(DMF)中に低温下で反応させると、1:1 錯体をつくる。酸素 2 個の単位は次式のように [Co(NH₃)₅OH₂]²⁺ と反応する。



単核酸素錯体はつぎに残りのペンタアミンアコ錯体と反応し、最終的には 2 核 Co 錯体をつくる。



[(NH₃)₅CoO₂Co(NH₃)₅]⁴⁺ の結晶構造を図-1²²⁾に示す。

図-1 [(NH₃)₅CoO₂Co(NH₃)₅]⁴⁺ の構造

この場合の O-O 結合距離は1.47Åであり、表-4に示した O₂²⁻ とほぼ一致する。

μ -ペルオキシ錯体では、O₂ 分子の架橋に対してシス位に空所がある場合は水溶液中で 2 つ目の μ -ヒドロキソ架橋が形成される。四座配位の12員環シクレン [図-2(1)] は、Co(II)や Co(III) とシス錯体のみをつくる。また、Co(II)-シクレンと O₂ との反応により [図-2(2)] に示す [(CoL)₂(O₂)(OH)]³⁺ をつくる²³⁾。

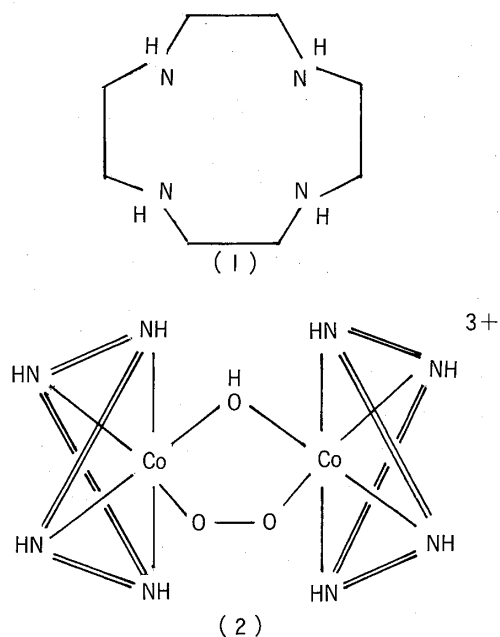


図-2 (1) 四座配置の12員環シクレン
(2) $[(\text{CoL})_2(\text{O}_2)(\text{OH})]^{3+}$

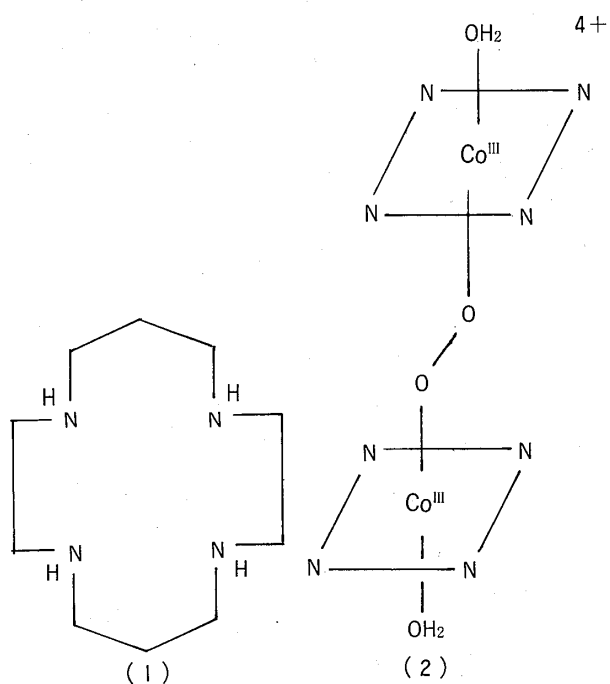


図-3 (1) 四座配置の14員環シクラム
(2) $[(\text{CoL})_2(\text{O}_2)(\text{H}_2\text{O})_2]^{4+}$

四座配置の14員環シクラム [図-3(1)] は、トランス錯体を優先的につくる。水溶液中で配位子の結合している $\text{Co}(\text{II})$ を空気中におくと [図-3(2)] に示す $[(\text{CoL})_2(\text{O}_2)(\text{H}_2\text{O})_2]^{4+}$ をつくる²³⁾。

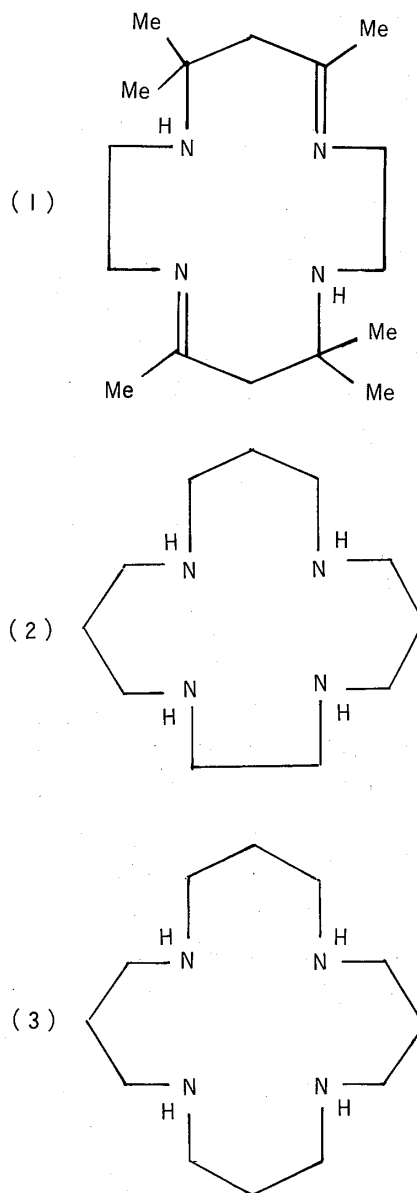
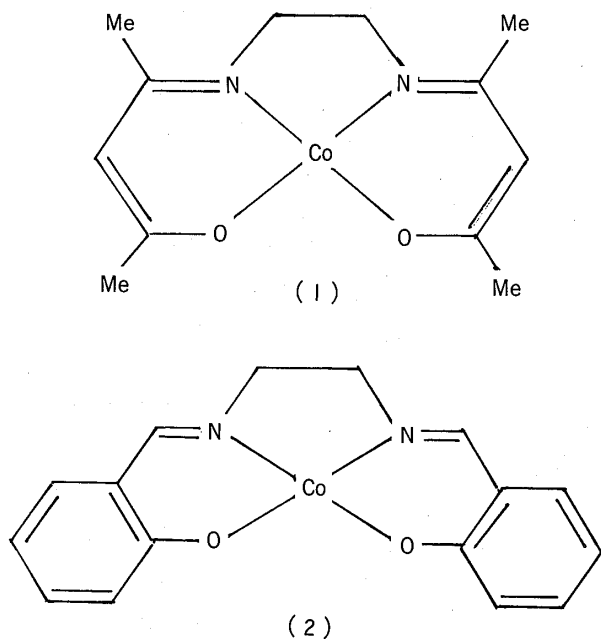


図-4 (1) Me_6 14員環-diene
(2)15員環-ane N_4
(3)16員環-ane N_4

アキシャル配座の水配位子は種々の陰イオン性 (Cl^- , Br^- , N_3^- , NO_2^- など) の配位子によって置換される。この形式の種々の μ -ペルオキシ錯体が単離研究されている。

大環状 $\text{Co}(\text{II})$ 錯体についてはまだ十分解明されていないが、4 配位、5 配位、6 配位錯体をつくる可能性がある と推察する。

Me_6 14員環-diene [図-4(1)] のような配位子が結合した $\text{Co}(\text{II})$ 錯体は、酸素の結合以前は低スピン種であるが、15員環-ane N_4 [図-4(2)] や 16員環-ane N_4

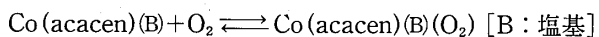


図一5 (1) ビスサリチルアルデヒドエチレンジアミン(salen)
(2) アセチルアセトアルデヒドエチレンジアミン(acacen)
の錯体構造

〔図一4(3)〕などのCo(II)錯体は高スピン種である。酸素結合速度に対するスピン状態の効果については現在研究しつつある²⁴⁾。

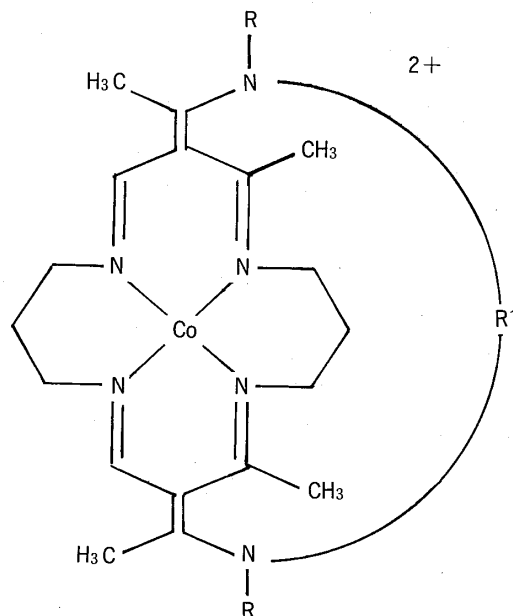
また、ビスサリチルアルデヒドエチレンジアミン(salen)〔図一5(1)〕やアセチルアセトアルデヒドエチレンジアミン(acacen)〔図一5(2)〕のような Schiff塩基配位子のCo(II)錯体とO₂との反応については非常に研究されている²⁵⁾。

Co(acacen)錯体は、ジメチルホルムアミドなど配位能力のある溶媒中あるいはトルエンなどの配位能力のない溶媒中に塩基(ピリジン、イミダゾール)が共存すると室温で緩慢にO₂を取り込むが、0℃またはそれ以下の温度では急速に、かつ可逆的にO₂の取り込みが起る。



ここでBがピリジンの場合、X線構造解析によると、Co-O-Oの結合角度は125°でO-O結合距離は1.2Åであり、表一4に示した分子状酸素(O₂)と一致している。

Co(II)ヘモグロビン(CoHb)とCo(II)ミオグロビン(CoMb)はO₂と可逆的に結合し、CoHbはO₂結合において十分なボーア効果とリン酸効果を示し、



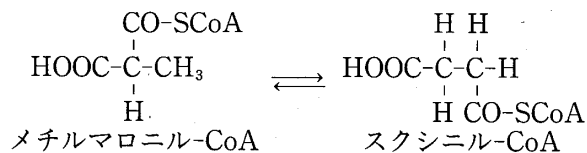
図一6 Buschらの考えた配位子を用いた合成モデル

結合は協同的で、少なくともHill定数2.3をもつ。CoHbの5配位の低スピンCo(II)プロトポルフィリンIXにO₂が結合して生じる立体的な変化は4次構造の変化の起因となると考えられている²⁶⁾。最近、配位子を用いたいくつかの合成モデルに関する報告がある²⁷⁾。図一6²⁸⁾に配位子を用いた合成モデルの1例を示す。

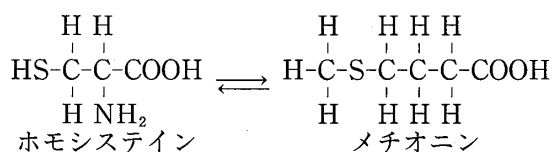
2. Coと酵素

(1) 酵素反応

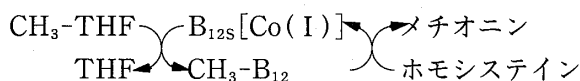
ヒト血清や組織中の主要なコリノイドはヒドロキシコバラミン(OH-Cbl)、メチルコバラミン(Me-Cbl)およびアデノシルコバラミン(Ado-Cbl)である。Ado-Cblはメチルマロニル-CoA ムターゼ(CoA: coenzymeA)より触媒されるメチルマロニル-CoAからスクシニル-CoAへの変換の補助因子である²⁹⁾。



Me-Cblはホモシステインからのメチオニン合成に関与している。



メチオニンシンテターゼは、メチオニン合成のため N^5 -メチルテトラヒドロ葉酸 (CH_3 -THF) からホモシステインへのメチル基の転移を触媒する。コリノイドは CH_3 - B_{12} の形成を経てメチル基を転移する作用があると考えられていて、つぎに示す反応が提唱されている。

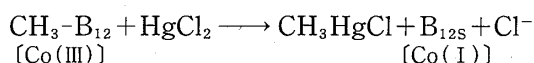


$\text{B}_{12\text{S}}$ と CH_3 -THF との反応からの CH_3 - B_{12} の形成と、それに続く Co 上のメチル基のホモシステインへの転移は、 ^{14}C を用いたトレーサ実験によって明らかにされている。

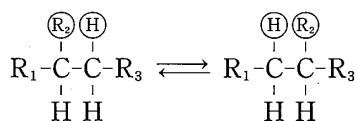
コバラミン依存性酵素中、アミノ酸配列が決定された酵素は現在ではないが、OH-Cbl 錯体である *Propionibacterium Shermannii* のメチルマロニル-CoA ムターゼのみが結晶化されている。

Co コリノイドを含む酵素は、つぎに示す 3 つの形式の反応を触媒する。

A. ホモシステインからのメチオニン形成やメチル水銀化合物形成におけるメチル基の転移。



B. イソメラーゼ反応で



C. リボヌクレオシド三リン酸の-CHOH-基の CH_2 -への還元。

A 形式の反応は $\text{Co}(\text{III})$ - CH_3 錯体の中間体生成を含む。B 形式と C 形式の反応は錯体が 5'-デオキシアデノシル配位子を含む補酵素型で存在することが必要である。イソメラーゼ型の反応機構については、現在も議論がなされている³⁰⁾。

(2) 酵素中における Zn と Co との交換性

カルボキシペプチダーゼ (CP) やカルボニックアンヒドラーゼ (CD) 中の $\text{Zn}(\text{II})$ は、8-ヒドロキシキノリンのようなキレート剤を用いる透析によって除

去される。したがって、タンパク質から Zn が失われることにより、当酵素活性が失われる。しかし、酵素活性はアポ酵素に $\text{Zn}(\text{II})$ 以外の 2 価金属イオンが結合することにより活性化することがある。CD の場合は $\text{Zn}(\text{II})$ と $\text{Co}(\text{II})$ のみが酵素活性化に有効である。CP のペプチダーゼ活性は $\text{Zn}(\text{II})$ や $\text{Co}(\text{II})$ と同様に $\text{Ni}(\text{II})$ でも有効であるが、 $\text{Co}(\text{II})$ 誘導体をもっとも高い活性 [$\text{Co}(\text{II})$: 12.0, $\text{Ni}(\text{II})$: 8.0, $\text{Zn}(\text{II})$: 7.5] を示す。 $\text{Zn}(\text{II})$ 酵素の他の酵素であるアルカリホスファターゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼにおいても $\text{Zn}(\text{II})$ を $\text{Co}(\text{II})$ に置換した酵素は活性を示す。

Co を大過剰に含む培地で生育させた微生物は $\text{Co}(\text{II})$ の結合した酵素を含むようになることも報告されている³¹⁾。

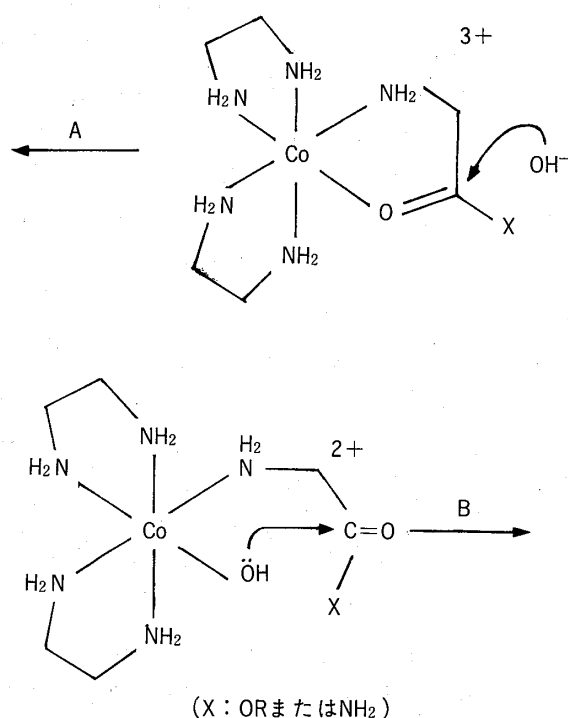
$\text{Zn}(\text{II})$ を $\text{Co}(\text{II})$ で置換すると $\text{Zn}(\text{II})$ の結合位置に $\text{Co}(\text{II})$ が結合することが明らかにされている。また、 $\text{Co}(\text{II})$ は $\text{Zn}(\text{II})$ と電子配列が異なり d^7 であるので金属イオンの環境に関する種々の分光学的、磁気的情報を与える利点がある。このことから、 $\text{Co}(\text{II})$ を含む酵素は酵素の金属イオン周辺の構造解析に対して有力なデータを提供する。

$\text{Co}(\text{II})$ が $\text{Zn}(\text{II})$ の位置に適合する理由として、 $\text{Co}(\text{II})$ 種々の立体的環境に入りやすい。すなわち、高スピン状態で八面体、四面体構造をとり、低スピン状態では平面正方形や 5, 6 配位の不斉な環境にも入る。特に他の遷移金属イオンに比して四面体配位が安定化されているためであると考えられている³¹⁾。

(3) Co によるカルボキシペプチダーゼのモデル

カルボキシペプチダーゼ (CPA) の作用については種々のモデル系が考えられている。その中の数種は動力学的に不活性な $\text{Co}(\text{III})$ 錯体を利用して、配位子の交換過程からおこる複雑さのない条件下で反応機構の輪郭を解明することを目的としている。種々の研究により、 $\text{Co}(\text{III})$ 錯体はアミド、エステル、ペプチド配位子の加水分解を促進する能力をもつことが示されている³²⁾。図-7³²⁾ に示すように、加水分解には 2 形式の経路がある。

A の機構では Co によって極性化されたカルボニル基が外部の水酸基によって攻撃されるが、B の機構ではフリーな配位カルボニル基が Co に結合した水酸化物イオンによって攻撃される (Co-OH_2 の $\text{pK} = 6$)。



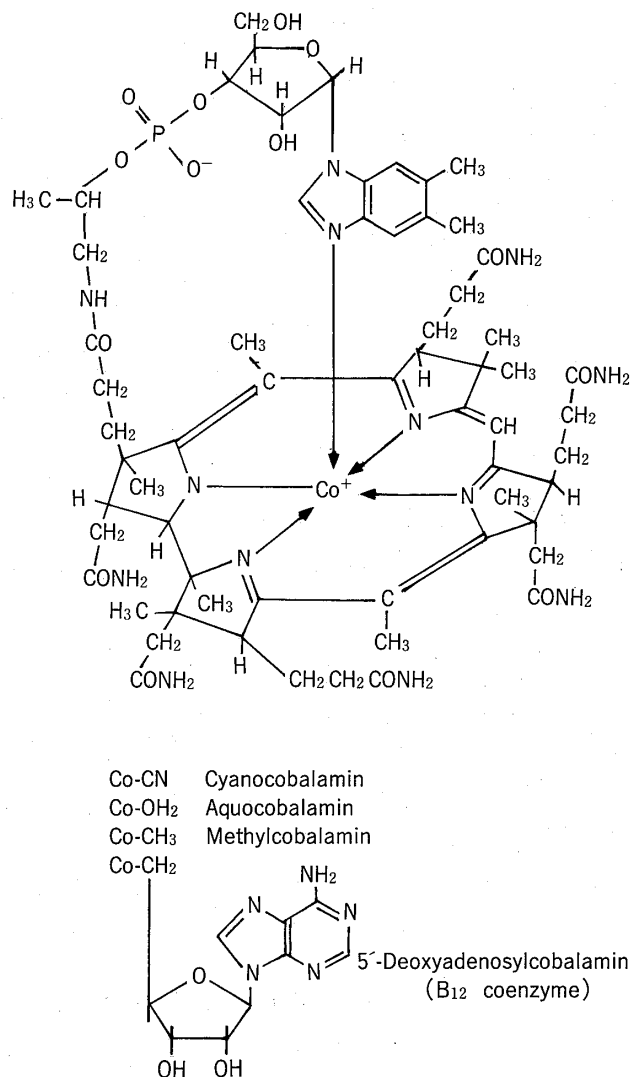
図一七 Co(III)錯体中のアミドおよびエステル配位子の加水分解経路

いずれの過程も配位されないアミド、エステル、ペプチドの2分子加水分解に比して極めて速く、また、 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2)]^{3+}$ の型的一座配位子錯体と比べても極めて速い。経路Bは一般的に経路Aよりもかなり速い。pH=9の条件下では、経路Bによるグリシンアミドの加水分解の反応速度は経路Aによる分解速度の 10^7 倍以上で、配位されていないグリシンアミドの分解速度の 10^{11} 倍以上である。

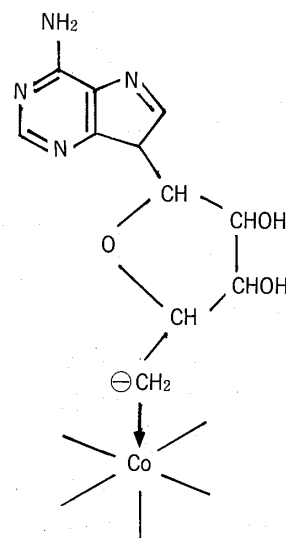
モデル系において配位されているアミドやエステルの金属水酸化物の分子内攻撃による加水分解が金属に結合したカルボニルへの溶媒の水酸化物イオンによる分子間攻撃よりもはるかに効果的であることが明らかにされている^{33),34)}。水酸化物イオンの塩基性はCo(III)に配位すると非常に低下するにもかかわらず、それが分子内反応に関与すると溶媒の水酸化物イオンよりもはるかに効果的な求核物質となる。

3. CoとビタミンB₁₂

Coが成長因子の1つとして必須元素であることが証明されて以来、1948年にビタミンB₁₂(B₁₂)の発見³⁵⁾について1958年にB₁₂の補酵素型の発見³⁶⁾、



図一八 ビタミンB₁₂の構造



図一九 コリノイド「補酵素」中に存在する5'-デオキシアデノシン配位子

1961年にX線構造解析により構造決定³⁷⁾、1972年に全合成が完成した³⁸⁾。図-8³⁹⁾にB₁₂の構造を示す。

B₁₂はコリノイドの1種(15員コリン環を含む)で、Co原子はCo(III)の状態です。2つのアキシアル位は種々の配位子によって占められている。

図-8のシアノコバラミンは生体から抽出された人工物であり⁴⁰⁾、生体内で作用する補酵素型は第6配位座が5'-デオキシアデノシンの5'-Cによって配位されたアデノシルコバラミンまたは第6配位座

がメチル基によって配位されたメチルコバラミンである。両コバラミンともに安定なCo-C結合をもつ水溶性有機金属錯体である。図-9⁴¹⁾にコリノイド補酵素中に存在する5'-デオキシアデノシン配位子の構造を示す。

これらのCo錯体は形式上配位したカルバニオンを含むCo(III)錯体と考えられている。

アデノシルコバラミン(AdoCbl)の関与する酵素反応は転移反応である。すなわち、炭素骨格の組み

表-5 アデノシルコバラミンが関与する酵素反応

| 酵 素 | 反 応 |
|-------------------------------------|---|
| Glutamate mutase | $\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\underset{\text{NH}_2}{\text{CHCO}_2\text{H}} \rightleftharpoons \text{HO}_2\text{C}\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}}\text{CHCO}_2\text{H}$ |
| Methylmalony-CoA mutase | $\text{HO}_2\text{C}\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{O}}{\text{CH}}}\text{C-S-CoA} \rightleftharpoons \text{HO}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{-S-CoA}$ |
| α -Methyleneglutarate mutase | $\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\overset{\text{CH}_2}{\underset{\text{CH}_2}{\text{CCO}_2\text{H}}} \rightleftharpoons \text{HO}_2\text{C}\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}}}\text{CCO}_2\text{H}$ |
| α -Lysine mutase | $\text{H}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_3\underset{\text{NH}_2}{\text{CHCO}_2\text{H}} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{C}\overset{\text{NH}_2}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CCH}}}(\text{CH}_2)_2\underset{\text{NH}_2}{\text{CHCO}_2\text{H}}$ |
| β -Lysine mutase | $\text{H}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\underset{\text{NH}_2}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CHCH}_2\text{CO}_2\text{H}}} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{C}\overset{\text{NH}_2}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CCH}}}\text{CH}_2\underset{\text{NH}_2}{\text{CHCH}_2\text{CO}_2\text{H}}$ |
| D-Ornithine mutase | $\text{H}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\underset{\text{NH}_2}{\text{CHCO}_2\text{H}} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{C}\overset{\text{NH}_2}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CCH}}}\text{CH}_2\text{CHCO}_2\text{H}$ |
| L-Leucine-2,3-aminomutase | $\text{H}_3\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CCH}}}\text{CH}_2\underset{\text{NH}_2}{\text{CHCO}_2\text{H}} \rightleftharpoons \text{H}_3\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CCH}}}\text{CHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ |
| Diol dehydrase | $\text{RCH}\overset{\text{OH OH}}{\text{CH}_2} \longrightarrow \text{RCH}_2\text{CHO} + \text{H}_2\text{O}$ |
| Glycerol dehydrase | $\text{HOCH}_2\overset{\text{OH}}{\text{CH}}\text{CH}_2\text{OH} \longrightarrow \text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{CHO} + \text{H}_2\text{O}$ |
| Ethanolamine ammonia lyase | $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH} \longrightarrow \text{H}_3\text{CCHO} + \text{NH}_3$ |
| Ribonucleotide reductase | $\text{Ribonucleotide} + \text{R(SH)}_2 \longrightarrow \text{Deoxyribonucleotide} + \text{RS}_2 + \text{H}_2\text{O}$ |

換え反応の酵素はグルタメートムターゼ, メチルマロニル-CoA ムターゼ, α -メチルレングルタレートムターゼ, アミノ基の分子内転位反応の酵素は α -リシンムターゼ, β -リシンムターゼ, D-オルニチンムターゼ, L-ロイシン-2,3-アミノムターゼおよび非可逆的に H_2O または NH_3 の脱離反応の酵素はジオールデヒドラゼ, グリセロールデヒドラゼ, エタノールアミンアンモニアリアーゼ, リボヌクレオチドレダクターゼである²⁾。表-5²⁾に AdoCbl が関与する酵素反応を示す。

リボヌクレオチドレダクターゼは DNA 合成の第一段階に関与する酵素で、Fe, Mn あるいは AdoCbl 要求型の 3 種がある。還元剤としてチオレドキシンも必要であり、中間体として Co(II) とラジカルが検出されている⁴²⁾。

Me-Cbl は CO_2 からの酢酸生成⁴³⁾, ホモシステインからのメチオニン生成⁴⁴⁾, CO_2 からのメタン生成⁴⁵⁾に補助因子として作用している。

哺乳類と鳥類の肝臓に存在している B_{12} の 80% 以上が補酵素の状態であり、6 番目のアキシアル位に σ -結合のメチル基をもつ B_{12} のメチル誘導体は何種かの微生物から単離されている。図-10⁴⁶⁾に B_{12} 誘導体の簡略構造を示す。

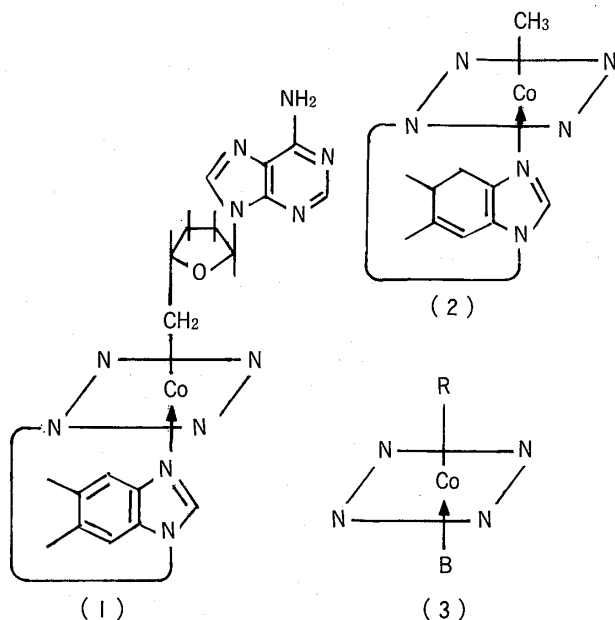


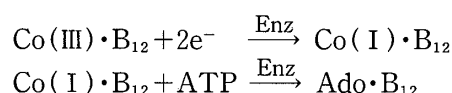
図-10 B_{12} 誘導体の構造

- (1) B_{12} 補酵素
- (2) メチル- B_{12}
- (3) B_{12} のアルキル誘導体

生体内での CN-Cbl から AdoCbl への変換は複雑な酵素反応で、この反応には ATP と共に Mg^{2+} , Mn^{2+} , NADH, FAD が必要である。反応の略式をつぎに示す。



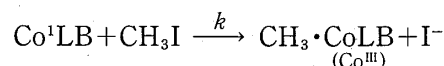
単離した酵素は 2 つの成分からなる。すなわち、 B_{12} 中の Co(III) の Co(I) ($\text{B}_{12\text{S}}$) への還元と、 $\text{B}_{12\text{S}}$ の Ado- B_{12} への変換を触媒することである²⁹⁾。



$\text{B}_{12\text{a}}$ (aquo) から $\text{B}_{12\text{r}}[\text{Co(II)}]$ への還元, $\text{B}_{12\text{r}}$ から $\text{B}_{12\text{S}}[\text{Co(I)}]$ への還元のように B_{12} には 2 つの 1 電子還元過程がある。

$\text{B}_{12\text{r}}$ は低スピンの Co(II) 錯体 (d^7) であり、 $\text{B}_{12\text{a}}$ の化学的還元や電解還元でつくることができる。ESR スペクトルは 4 配位錯体を示すものと、5 配位錯体を示すものと 2 つの異なった形式となる。どちらの型の錯体も電子配置は $(d_{yz})^2 (d_{zx})^2 (d_{x^2-y^2})^2 (d_z)^1 (d_{xy})^0$ と考えられている。 $\text{B}_{12\text{r}}$ の d_z 軌道の不対電子はラジカルのような作用をすると考えられていて、可逆的に O_2 分子と結合して単核 O_2 分子錯体を形成する。

$\text{B}_{12\text{S}}[\text{Co(I)}]$ は B_{12} または $\text{B}_{12\text{r}}[\text{Co(II)}]$ から酵素的還元や化学的還元 (Na, Hg あるいは BH_4^- による)、電解還元によってつくられる。Co(I) は d^8 配置をとり、一般に低スピンである。 $\text{B}_{12\text{S}}$ と Co(I) のモデル化合物の電子配置は $(d_{yz})^2 (d_{zx})^2 (d_{x^2-y^2})^2 (d_z)^2 (d_{xy})^0$ で、5 配位の四角錐形か 4 配位の平面構造をとる。低酸化状態と四角形構造のため、 $(d_z)^2$ 電子は強力な求核非共有電子対として作用する。 $\text{B}_{12\text{S}}$ とモデル化合物中の Co(I) の求核性は Schrauzer ら⁴⁷⁾によって研究され、その結果、ヨウ化メチルへの求核性の程度を規定する n 値で表現している。 n 値はヨウ化メチルと求核試薬との \log 値である。



ここで $n = \log k$ となる。 n の典型的な値を表-6⁴⁷⁾に示す。

表一 6 各種求核試薬の求核性

| 求核試薬 | nCH ₃ I |
|---|--------------------|
| CH ₃ OH | 0.00 |
| NH ₃ | 5.50 |
| I ⁻ | 7.42 |
| P(n-C ₄ H ₉) ₃ | 8.69 |
| Co ^I (DMG) ₂ (P-nC ₄ H ₉) ₃ | 13.3 |
| Co ^I (DMG) ₂ (py) | 13.8 |
| Co ^I (B ₁₂ S) | 14.4 |

表一 6 から、B₁₂S とジメチルグリオキシム (DMG) のモデル化合物中 Co(I) の非常に高い求核性が理解できる。

B₁₂ の複雑で広範囲な反応性を理解するために種々のモデル錯体を用いて研究がおこなわれている。それらのモデル錯体の数種を図一11⁴⁸⁻⁵²⁾に示す。

4. Co の栄養

単体としての元素で欠乏症が知られたのは歴史的には第一に鉄、第二にヨウ素であり、第三にコバルトである。

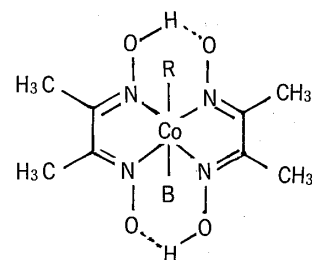
ヒトにおいては Co は、B₁₂ として必要性がみとめられているのであり、その必要量は Fe の 1/100000 であるが、食物中の Co としてというよりも B₁₂ という化合物が必須であることに注目されている。Co の欠乏症状を示す量はまだ不明であるが、適正摂取量としては B₁₂ として 1 日当り 0.0001~0.00015mg で、過剰症状を示す量は Co として 1 日当り 20~30mg としている⁵³⁾。

最近、中川ら⁵⁴⁾は、加齢によるヒト血液中微量元素量の変動について (全血: 19才~91才57名、血漿: 25~84才50名) 報告している。Co 濃度については、全血中 Co は $0.139 \pm 0.372 \text{ ng/cm}^3$ 、血漿中 Co は $0.031 \pm 0.011 \text{ ng/cm}^3$ 、また、年齢と Co 濃度との相関は、全血は 0.2435、血漿は -0.0252 であることから、Co 濃度は加齢にともなって低下する傾向に思える。このことは加齢にともなって造血機能の低下とも考えられる。

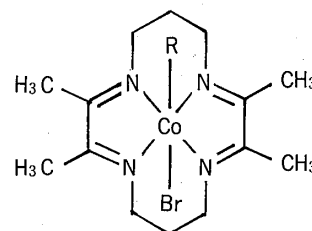
食品中の Co(B₁₂) 摂取については、B₁₂ は動物性食品にのみ含まれているので、菜食のみによる B₁₂ 欠乏の可能性も考えられる。

一般に使用している食品中 Co 濃度および B₁₂ 中の Co 量を表一 7¹⁵⁾に、食品群別 Co 摂取推定量を表一 8^{15), 55)}に示す。

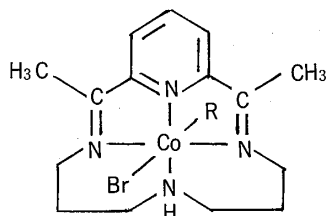
(1)

[RCo(dmg)₂B]

(2)

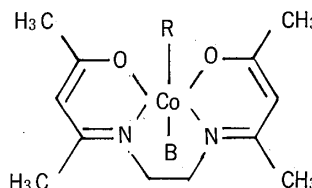
[RCo(tim)Br]⁺

(3)

[RCo(cr)Br]⁺

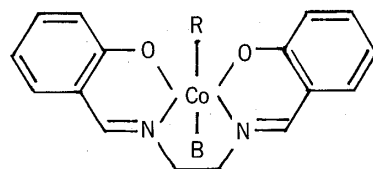
(4)

[RCo(acacen)B]



(5)

[RCo(salen)B]

図一11 B₁₂のモデル錯体

- (1) Schrauzer のモデル⁴⁸⁾
- (2) Farnery と Busch のモデル⁴⁹⁾
- (3) Ochiai と Busch のモデル⁵⁰⁾
- (4), (5) Costa のモデル^{51, 52)}

表一 7, 表一 8 を通じて、全 Co としては魚介類がもっとも多い摂取源で、野菜類、穀類、果実類、畜肉類の順になっているが、B₁₂ に含まれている Co 量は魚介類、畜肉類、卵類、乳類がほとんどすべてを占めている。

5. 家畜における Co

家畜における Co 欠乏症状は、反すう動物では Co

表一 食品中Co量およびB₁₂中Co量(μg/g)

| 食 品 | 全Co量 | B ₁₂ 中Co量 |
|--------|------|----------------------|
| 牛 肝 臓 | 47 | 2.17 |
| 豚 肝 臓 | 41 | 1.30 |
| 牡 蛎 | 18 | 0.65 |
| 豚 肉 | 23 | 0.13 |
| タ ラ | 121 | 0.09 |
| 鶏 卵 | 10 | 0.07 |
| 牛 肉 | 10 | 0.06 |
| エ ビ | 181 | 0.04 |
| 鶏 肉 | 29 | 0.02 |
| 牛 乳 | 6 | 0.01 |
| ココア(粉) | 171 | 0 |
| 紅 茶 葉 | 62 | 0 |
| 紅茶浸出液 | 1 | 0 |
| キャベツ | 55 | 0 |
| 小 麦 | 50 | 0 |
| 落 花 生 | 37 | 0 |
| タマネギ | 12 | 0 |
| 食 パ ン | 11 | 0 |
| 玄 米 | 10 | 0 |
| ニンジン | 10 | 0 |
| ジャガイモ | 10 | 0 |
| バ ナ ナ | 5 | 0 |

欠乏により食欲不振の症状を示すが、他の単胃動物ではこのような症状を示さないのが特徴である⁵⁶⁾。

ウシやヒツジの食欲不振症状の出現は古くから世界各地で知られていて、症状の名称は地域によって異なり、オーストラリアでは enzootic marasmus, wasting disease, ニュージーランドでは bush sickness, 米国では cost disease, 英国では pine disease そして日本では「くわす症」という^{57), 58)}。

1935年、オーストラリアにおいて初めて本症の原因が牧草中の Co 量によることが明らかにされて以来、世界各地で本症が Co 欠乏によることが確認され、我が国の「くわす症」も1952年に Co 欠乏が原因であることが判明した⁵⁹⁾。

前述のように、Co 欠乏症を示す家畜はウシ、ヒツジなど反すう動物のみであるが、反すう動物では通常飼料中に含まれている Co を利用して反すう胃内で B₁₂ を合成し吸収する。したがって、Co 欠乏症状の反すう動物に Co 塩を経口投与すると顕著な効果を示すが、Co の静注は効果を示さない。しかし B₁₂ の投与は経口、静注とも有効である。以上のことから反すう動物の Co 欠乏症は B₁₂ 欠乏症であると結

表二 食品群Co摂取推定量

(1) 全Co摂取量 (1日当り300μg)

| 食 品 | Co (%) | Co (μg) |
|--------|--------|---------|
| 魚 介 類 | 46.6 | 139.8 |
| 野 菜 類 | 14.1 | 42.3 |
| 穀 類 | 11.1 | 35.1 |
| 果 実 類 | 7.2 | 21.6 |
| 調味料・飲料 | 2.8 | 8.4 |
| 油 脂 類 | 2.2 | 6.6 |
| 豆 類 | 2.0 | 6.0 |
| イ モ 類 | 2.0 | 6.0 |
| 畜 肉 類 | 3.3 | 9.9 |
| 卵 類 | 1.4 | 4.2 |
| 乳 類 | 2.5 | 7.5 |
| そ の 他 | 4.8 | 12.6 |

(2) B₁₂中に含まれるCo摂取量 (1日当り0.18μg)

| 食 品 | Co (%) | Co (μg) |
|-------|--------|---------|
| 魚 介 類 | 42.2 | 0.076 |
| 畜 肉 類 | 29.5 | 0.053 |
| 卵 類 | 16.7 | 0.030 |
| 乳 類 | 11.6 | 0.021 |

論づけらる。

反すう動物における Co 欠乏による食欲不振の機構は、反すう動物にプロピオン酸 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ を静脈中に負荷した場合、血液中のプロピオン酸濃度が上昇し、その後次第に下降するが、Co 欠乏状態の場合は正常状態の場合より血中プロピオン酸濃度の下降時間が長い。また、Co 欠乏状態のウシやヒツジ尿中にはメチルマロン酸 $\text{HOOC-CH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$ (プロピオン酸の中間代謝物質) が多量に含まれている。このことは、反すう動物では Co 欠乏 (B₁₂ 欠乏) によってプロピオン酸の代謝が阻害されていることを示している。

反すう動物は単胃動物と異なり、飼料中の糖質の大部分を反すう胃内微生物の作用により揮発性脂肪酸 (主に C₁₀ 以下の低級脂肪酸) にいたるまで分解、合成して吸収する⁶⁰⁾。そのためプロピオン酸は反すう動物にとって重要な物質であり、また、体内で多量のプロピオン酸が酸化されてエネルギー源となる。したがって、プロピオン酸の代謝が阻害されると血中プロピオン酸が蓄積し、食欲不振の主因となる⁶¹⁾。一方、ブタやニワトリなど単胃動物における B₁₂ 欠乏症状は反すう動物とは異なり、主な症状は悪性貧

血症状である⁶¹⁾。

6. 魚類における Co

魚類においても Co は B₁₂を構成する元素であり、Co あるいは B₁₂の欠乏により障害をきたす。魚体の生理機能は魚種によって異なる。B₁₂欠乏により、マスノスケでは、Hb 量の異常変動、赤血球の変形および多数の幼芽血球がみられ⁶²⁾、アメリカナマズでは、食欲不振のため増重率が低下し⁶³⁾、ウナギでは、食欲不振と成長停滞がみられる⁶⁴⁾。しかし、コイでは、食餌性 B₁₂欠乏症状はみられない^{65), 66)}。コイはおそらく腸内細菌によって B₁₂が供給されているものと考えられている⁶⁶⁾。能勢⁶⁷⁾のおこなったコイによる実験では、Co 欠乏により貧血症状が発現している。このことは、Co 欠乏により腸内細菌による B₁₂の合成が停滞していることを示していると考えられる。また、一方、制菌剤（サルファ剤）を投与されたコイでは、腸管内における B₁₂の増加がみられない⁶⁸⁾ことから、コイは腸内細菌によって B₁₂が合成されると理解できる。

養殖魚飼料中の B₁₂量について、マスノスケおよびギンザケには飼料 1kg 当り 0.015~0.02mg の B₁₂添加が必要としているが⁶⁹⁾、その他の養殖魚種では、B₁₂欠乏症予防に B₁₂の補給が必要であることは明らかであるが、要求量はまだ不明である。

つぎに、各魚種中の B₁₂含量を表—9^{70~76)}に示す。

赤身のマグロ、サバ、イワシなどの魚種は白身のタラなどの魚種に比べて肝臓中 B₁₂濃度が高い。とくに、マグロ肝臓中には 310~353 μ g/100g と高濃度である。筋肉における B₁₂濃度は、血合肉は普通肉の 5~10 倍の濃度である。

表—9 魚種各部位中の B₁₂濃度 (μ g/100g 新鮮物)

| 魚 種 | 肝臓 | 筋肉 | 血合肉 | 普通肉 |
|---------|----------|-----------|----------|----------|
| マ グ ロ | 310~353 | 0.27~3.7 | 0.83 | 0.048 |
| カ ツ オ | 9 | 1.2 | 16.2 | 2.5 |
| サ バ | 7.4 | 4.4 | 4.2, 8.0 | 0.9, 1.5 |
| ア ジ | 32 | 12.7 | 7.8 | 0.3 |
| ブ リ | | | 6.8 | 1.3 |
| ニ シ ン | 5~7 | 0.47~2.4 | | |
| マ イ ワ シ | 4~13 | 0.74~2.5 | | |
| カタクチイワシ | 4 | 0.33 | | |
| カ マ ス | 7~19 | 0.08~0.21 | 0.05 | 0.009 |
| オ ヒ ヨ ウ | 89 | | | |
| タ ラ | 0.9, 4.5 | 0.09, 0.5 | | |
| スケトウダラ | 33 | 1.8 | 2.4 | 0.3 |

B₁₂は凍結貯蔵（-24℃）中ではほとんど欠損はないが、塩蔵および加熱処理（200~205℃）によって 35~41%の損失がある⁷⁷⁾。缶詰製造および缶詰保存中の損失は比較的少ない⁷⁵⁾。

7. Co の毒性

Co の毒性に関する研究は 1970~1980 年代に多くなされている。

Co の致死量に関しては、金属コバルト、酸化コバルト、無機コバルト塩をラット、マウス、ウサギに経口、筋注、腹腔注、静注、皮下注によって Co を投与した場合の 50%致死量、100%致死量の報告がある^{78~82)}。

経口による中毒症状は下痢、後肢麻痺、血圧低下、体温低下であり、病理学的には臓器のうっ血、出血、腎臓や脾臓の変性などが認められている。吸入による症状は気道刺激、肺水腫、出血、骨髓増殖、血管性透過亢進が起り、非経口的投与では線維肉腫、脂肪肉腫、甲状腺腫瘍が認められている。

ヒトの経口的水溶性 Co の安全摂取量は 1 日当り 2~7 mg/kg で、小児では感受性が強い^{79), 83)}。また、3~10mg を 2 週間投与すると多血症、甲状腺腫が発現するといわれているが、一方では貧血症の治療に 300mg の Co を投与することもある。

1960 年代にアメリカ、カナダ、ベルギーでビールの泡の安定剤として 1.2~1.5ppm の Co が添加されたことがあり、特定のビール常飲者 20 名以上が心臓や甲状腺異常で死亡した。この原因については、尿への Zn と Mg の排泄量が増加したため、Zn と Mg の急激な欠乏によると考えられている⁷⁹⁾。

職業的な Co による障害は、長期的な職業性コバルト暴露によって塵肺結節と線維化が発現し、また、アレルギー性皮膚炎もみられる。

Co と癌との関係については、Co(II)塩は発癌遺伝子の修飾や老化などの要因となる因子として⁸⁴⁾、さらに慢性の血液病にも係わっているとも考えられている^{85), 86)}。しかし、Co はメチルコラントレン (C₂₁H₁₆、コールタール抽出物質で代表的癌原性芳香族炭化水素) の作用を抑制し、また、Co は胆汁からの Pb 排泄を促進

する作用があるので鉛中毒症の軽減などの有効性もある⁸⁷⁾。

以上、生体内におけるコバルトについて考察を述べたが、生命体の複雑な環境の中で遷移元素であるコバルトの作用はまだ未知のことが多々ある。今後の研究に期待する。

文 献

- 1) Cotton, F. A. and Wilkinson, G. : Advanced Inorganic Chemistry, 5th. ed. 724, John Wiley and sons (1988)
- 2) Hughes, M. H. : Comprehensive Coordination Chemistry, 6, 637, ed. G. Wilkinson, Pergamon Press (1987)
- 3) 舟木行雄：駒沢女子短期大学研究紀要, 24, 51~54 (1991)
- 4) Dobos, D. : Electrochemical Data, Elsevier (1975)
- 5) 日本分析化学会編：周期表と分析化学, 丸善, 384 (1975)
- 6) 化学の領域(特集号, 37, 8)：微量元素と生物圏, 南江堂, 11 (1983)
- 7) 桜井 弘, 田中英彦編：生体微量元素, 廣川書店, 184 (1994)
- 8) 不破敬一郎編：生体と重金属, 講談社, 14 (1981)
- 9) 化学の領域(特集号, 37, 8)：微量元素と生物圏, 南江堂, 16 (1983)
- 10) 山県 登：微量元素—環境科学持論, 産業図書, 32 (1977)
- 11) 化学と工業(特集, 人間と化学)：23, 10日本化学会, 156 (1970)
- 12) Tipton, I. H. : Gross and Elemental Composition of Reference Man, ICRP Handbook, Pergamon Press (1974)
- 13) 和田 攻：金属とヒト, 朝倉書店, 234 (1985)
- 14) Burch, R. E., Hahn, H. K. J. and Sullivan, J. F. : Clin. Chem. 21, 501~520 (1975)
- 15) Orr, M. L. : Home Ec. Res. Rep., 36 (1969)
- 16) 舟木行雄：駒沢女子短期大学研究紀要, 22, 2~4 (1989)
- 17) 舟木行雄：駒沢女子短期大学研究紀要, 25, 46~49 (1992)
- 18) 舟木行雄：駒沢女子短期大学研究紀要, 26, 70~73 (1993)
- 19) 舟木行雄：駒沢女子短期大学研究紀要, 27, 52~59 (1994)
- 20) 舟木行雄：駒沢女子短期大学研究紀要, 28, 44~46 (1995)
- 21) Sykes, A. G. and Weil, J. A. : Prog. Inorg. Chem., 13, 1 (1970)
- 22) 田中 久, 桜井 弘：生物無機化学, 廣川書店, 42 (1987)
- 23) 太田次郎, 竹内敬人, 室伏きみ子：生体無機化学, オーム社, 109 (1986)
- 24) 太田次郎, 竹内敬人, 室伏きみ子：生体無機化学, オーム社, 110 (1986)
- 25) 田中 久, 桜井 弘：生物無機化学, 廣川書店, 43 (1987)
- 26) 太田次郎, 竹内敬人, 室伏きみ子：生体無機化学, オーム社, 107~112 (1986)
- 27) Stevens, J. C., Jackson, P. J., Schammel, W. P., Christoph, G. C. and Busch, D. H. : J. Am. Chem. Soc., 102, 3283 (1980)
- 28) 太田次郎, 竹内敬人, 室伏きみ子：生体無機化学, オーム社, 112 (1986)
- 29) 松島美一, 高島良正：生命の無機化学, 廣川書店, 202~203 (1987)
- 30) 太田次郎, 竹内敬人, 室伏きみ子：生体無機化学, オーム社, 147~149 (1986)
- 31) 松島美一, 高島良正：生命の無機化学, 廣川書店, 193~195 (1987)
- 32) Hay, R. W. : Metal Ions in Biological Systems, 15, ed. H. Sigel, Marcel Dekker, New York (1976)
- 33) Buckingham, D. A. : "Metal-OH and its Ability to Hydrolyse Substrate of Biological Interest", in Biological Aspects of Inorganic Chemistry, ed. A. W. Addison, W. R. Cullen, D. Dolphin and B. R. James, Wiley-Interscience, New York (1977)
- 34) Dixon, N. E. and Sargeson, A. W. : Roles for the Metal Ion in Reaction of Coordinated Substrates and in Some Metalloenzymes; in Zinc Enzymes, ed. T. G. Spiro, John Wiley and

- sons, New York (1983)
- 35) Smith, E. L. and Parker, L. F. G. : Biochem. J. 43, VIII-IX (1948)
- 36) Barker, H. A., Weissbach, H. and Smith, R. D. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 44, 1093~1097 (1958)
- 37) Lenhart, P. G. and Hodkin, D. C. : Nature, 192, 937~938 (1961)
- 38) Woodward, R. B. : Pure Appl. Chem. 33, 145~177 (1973)
- 39) 久保田晴寿 : 無機医薬品化学, 廣川書店, 129 (1992)
- 40) 虎谷哲夫, 福井三郎 : 金属タンパク質の化学, 講談社サイエンティフィック, 225~237 (1983)
- 41) 太田次郎, 竹内敬人, 室伏きみ子 : 生体無機化学, オーム社, 145 (1986)
- 42) Tamao, Y. and Blakley, R. L. : Biochemistry, 12, 24~34 (1973)
- 43) Ljungdahl, L. G. and Wood, H. G. : B₁₂, 2, 165, ed. D. Dolphin, Wiley (1982)
- 44) Taylor, R. T. : B₁₂, 2, 307, ed. D. Dolphin, Wiley (1982)
- 45) Taylor, D. D. and Wolfe, R. D. : J. Biol. Chem., 249, 4879~4890 (1974)
- 46) 太田次郎, 竹内敬人, 室伏きみ子 : 生体無機化学, オーム社, 146 (1986)
- 47) Schrauzer, G. N., Deutch, E. and Windgassen, R. J. : J. Am. Chem. Soc., 90, 2441 (1968)
- 48) Schrauzer, G. N. : Accounts Chem. Res. 1, 97 (1968)
- 49) Farnery, M. and Busch, D. H. : Chem. Commun., 1970, 1019 (1970)
- 50) Ochiai, E. and Busch, D. H. : Chem. Commun., 1968, 905 (1968)
- 51) Costa, M. A. : J. Organomet, Chem; 6, 181 (1966)
- 52) Costa, M. A. : J. Organomet, Chem; 11, 333 (1968)
- 53) 化学の領域 (特集, 37, 8) : 微量元素と生物圏, 南江堂, 23 (1983)
- 54) 中川典子, 高倉昌之, 斎藤 健, 斎藤和雄 : 日本微量元素学会誌, 5 (3) (1994)
- 55) Schroeder, H. A. : J. Chron. Dis. 20, 869 (1967)
- 56) Maynard, A. and Loosli, J. K. : Animal Nutrition, 5th. ed. 161, McGraw-Hill Book co. Inc., New York (1962)
- 57) 上坂章二 : 日畜会報, 24, 125~151 (1954)
- 58) 岩田久敬 : 畜産の研究, 7, 771 (1953)
- 59) 川島良治 : 微量栄養研究, 1, 1 (1984)
- 60) 梅津元晶, 大森昭一良 : 乳牛の化学, 農山漁村文化協会, 115 (1966)
- 61) 木村修一, 左右田健次 : 微量元素と生体, 秀潤社, 160~162 (1987)
- 62) Halver, J. E. : J. Nutr., 62, 225~243 (1957)
- 63) DuPree, H. K. : U. S. Bureau of Sport Fisheries and Wild Life Technical Papers, 7, (1966)
- 64) Arai, S., Nose, T. and Hashimoto, Y. : Bull. Freshwater Fish. Res. Lab., 22, 69~83 (1972)
- 65) 北村佐三郎, 諏訪富雄, 大原脩平, 仲川憲一 : 日水誌, 33, 1120~1125 (1969)
- 66) 橋本芳郎 : 日水誌, 19, 899~904 (1953)
- 67) 能勢健嗣 : 養魚飼料学, 恒星社厚生閣, 159~183 (1976)
- 68) Kashiwada, K., Teshima, S. and Kanazawa, A. : Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 36, 421~424 (1970)
- 69) Halver, J. E. : The Vitamins, in "Fish Nutrition." ed. J. E. Halver, 30~103, Acad. Perss, New York (1972)
- 70) Breakkan, D. R. : Nature, 178, 747~748 (1956)
- 71) Breakkan, D. R. : Nature, 182, 1386 (1958)
- 72) 梁瀬正明 : 日水誌, 18, 629~635 (1953)
- 73) 森高次郎, 橋本芳郎, 小俣 靖 : 日水誌, 21, 1233~1235 (1956)
- 74) 村山繁雄, 田部井菊子 : 日水誌, 22, 136~141 (1956)
- 75) 小俣 靖, 橋本芳郎, 森高次郎 : 日水誌, 21, 1236~1240 (1956)
- 76) 橋本芳郎, 山田茂英, 森高次郎 : 日水誌, 19, 135~140 (1953)
- 77) Shoshkov, D. and Monov. G. : Nauchni Tr., Vissh Veterinarnomed. Inst. Sofia, 23, 617~627 (1973)
- 78) Underwood, E. J. : Trace Element in Human and Animal Nutrition, Academic Press (1977)
- 79) Davis, I. J. T. : The Clinical Significance of

- the Essential Biological Metals, 94, William
Heineman Med. Book (1972)
- 80) Kipling, M. P. : Cobalt Metal in the Environ-
ment, 133, ed. H. A. Walden, Academic Press
(1980)
- 81) 和田 攻 : 金属とヒト, 朝倉書店 (1985)
- 82) Venngopal, B. : Metal toxicity in Mammals,
2, 245, Plenum (1978)
- 83) 佐藤哲男, 本山直樹 : 毒性生化学, ソフトサイ
エンス, 313~314 (1982)
- 84) Kiem, J. and Feinendegen, L. E. : "Trace Element
Analytical Chemistry in Medicine and Biol-
ogy"2, 607~634, de Gryte, Berlin (1984)
- 85) Calabrese, E. J., Canada, A. T. and Sacco, C.
: Annu. Rev. Public Health, 6, 131~146 (1985)
- 86) Smith, A. G. and Smith, A. N. : Toxicol. Lett.,
23, 349~352 (1984)
- 87) 桜井 弘, 田中英彦 : 生体微量元素, 廣川書店,
185~186 (1994)